

氏 名	今 井 友 裕
学 位 の 専 攻 分 野 の 名 称	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	甲理第150号 (文部科学省への報告番号甲第493号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2013年9月25日
学 位 論 文 題 目	<b>ヒト皮膚角層細胞間脂質層における オーソロンビク-ヘキサゴナル相転移機構の解析</b>
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 瀬 川 新 一 (副査) 教 授 高 橋 功 教 授 加 藤 知

ヒトの体表を覆う薄層である皮膚は、外部からの異物の侵入に対する最初の防壁であると同時に、体内からの水分蒸散を制御する巧妙なフィルターとして機能している。これらのバリア機能は、皮膚最外層に位置する厚さ10  $\mu\text{m}$  ほどの角層内の細胞間脂質層が担っていると考えられており、細胞間脂質層の微細構造の研究が精力的に行われているが、不明な点が多く残されている。本論文の著者は、皮膚バリア機能と密接に関係することが示唆されている細胞間脂質の側方充填構造の温度相転移に着目し、その相転移挙動の詳細な解析を行っている。微細構造解析を進めるにあたって、著者は従来の電子線回折法を改良し、極めて低流量の電子線によって回折像を得る手法を確立することにより、電子線損傷の影響を十分排除して1個の角層細胞上の細胞間脂質層の温度相転移挙動を追跡することに成功している。また、電子線回折実験で得られた結果を、美容整形手術で切り出した角層シートを用いた放射光 X 線回折実験と比較し、1個の角層細胞を皮膚表面から剥離したことの影響を評価している。その結果、剥離した角層細胞上の細胞間脂質層でも角層内にある場合と基本的に同じ温度相転移を示すこと、生理的温度付近で見られる脂質側方充填構造のオーソロンビク相からヘキサゴナル相への相転移挙動は、これらの相のドメイン分布に依存していることを明らかにした。さらに放射光 X 線を用いた温度相転移の履歴現象の解析により、オーソロンビク-ヘキサゴナル相転移にともなって脂質分子の拡散が起こっていることを示唆する結果を得ている。これらの結果は、角層細胞間脂質層の微細構造と機能の関係を考える上で重要な基礎的知見を与えるものであり、高く評価できる。

## 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、皮膚のバリア機能と密接に関係すると考えられている皮膚角層細胞間脂質の側方充填構造の温度相転移について、詳細な解析を行ったものである。前半では、ヒト皮膚表面から剥離した1個の角層細胞上の細胞間脂質層と美容整形手術で切り出された角層シート中の細胞間脂質層の温度相転移挙動を定量的に比較している。

角層細胞は、接着剤を塗布した電子顕微鏡用グリッドを皮膚表面に押しつけて1層のみ剥離する方法によって、ほぼ非侵襲的に採取している。採取した角層細胞の電子線回折実験は、試料が電子線損傷に極めて弱いため、 $1\text{ e} \cdot \text{nm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  以下の非常に低い電子線流量で行っている。検出器として高感度の CCD カメラを用いることにより、低電子線照射量でも明瞭な回折像を得ている。さらに、1個の角層細胞の温度を電子顕

微鏡内で変化させて定量的に構造変化を追跡するために、電子線流量の定量的な見積もり、熱ドリフトの影響の排除、フィラメントからの電子線放出量の安定化、カメラ長の正確な見積もりに関して慎重に検討して実験を行っている。特に電子線損傷については、各相ごとにその影響を定量的に見積もっている。また、電子線損傷の温度依存性についても実験を行って、得られた結果に対する電子線損傷の影響が十分小さいことを確認している。

角層シートの放射光 X 線回折実験は、SPring-8のビームラインを用いて、角層細胞の電子線回折実験と同様 1℃ /min の昇温速度で行っている。両者を比較し、角層細胞の剥離が細胞間脂質層の構造にどのような影響を与えているか考察している。オーソロンビック相とヘキサゴナル相が共通にもつ 4.1nm の格子面間隔に由来する回折ピークの振る舞いの定量的な比較から、剥離によってわずかに格子面間隔が増加しているが、基本的には同じ温度相転移挙動を示すことを示唆する結果を得ている。また、電子線回折では局所的な構造解析が可能であることを利用して、相転移挙動が相の分布の違いにどのように依存するか調べた結果、比較的大きなオーソロンビック相ドメインの場合とオーソロンビック相とヘキサゴナル相ドメインが共存する場合で、相転移挙動が異なることを見出している。これらの結果は、剥離した角層細胞に特有なものではなく角層シートの放射光 X 線回折実験の結果とも矛盾しないことを、X 線回折プロファイルの温度変化の差分を取ることで確認している。

上記の結果は、オーソロンビック相とヘキサゴナル相を構成する脂質分子が相転移過程で混ざり合って、元々のヘキサゴナル相よりも格子面間隔の広い新たなヘキサゴナル相が形成することを示唆するものであるが、論文の後半では放射光 X 線を用いて相転移の履歴現象を詳細に解析することで、この点をさらに追及している。オーソロンビック相が転移する温度まで昇温後、室温まで戻したときのオーソロンビック相回復過程を追跡する実験や、高温に放置する時間が回復過程に与える影響を評価することにより、速い緩和過程で回復する成分と短時間では回復しない成分が存在することを明らかにしている。これらの結果を説明するために、著者は高温で脂質分子の拡散が起こる相転移過程のモデルを提案している。

最後に、オーソロンビック-ヘキサゴナル相転移が角層のバリア機能にどのように影響するか調べるために、経皮水分蒸散量の温度依存性の解析を行っている。温度制御した金属ブロックを接触させてヒト皮膚表面温度を変えた直後の経皮水分蒸散量は、オーソロンビック-ヘキサゴナル相転移温度付近で増大することを見出している。

## 論文審査結果の要旨

本論文は、皮膚のバリア機能を理解する上でキーとなる角層細胞間脂質層の微細構造について、その温度相転移挙動に注目して解析を行った結果を報告している。本論文の著者は、研究遂行のために、従来の電子線回折法の改良を行い、電子線損傷に極めて弱い皮膚角層試料でも信頼性の高い回折像を得ることに成功している。単に高感度 CCD カメラを用いることにより電子線照射量を低くしただけでなく、温度変化にともなう構造変化を定量的に評価できるようにするために、熱ドリフトを巧妙に補正したりカメラ長を正確に見積もるなど、随所に工夫が見られる。これらの工夫は、著者が皮膚角層の電子線回折実験の問題点を的確に把握し、それに対処する優れた能力をもつことを示している。また、皮膚表面から剥離した単一の角層細胞を用いて詳細な構造解析できる手法を確立したことにより、角層の微細構造の個人差、季節差、部位差、深さ依存性などの精緻な解析が可能となる。これは、倫理的な問題から非侵襲的に採取したヒト皮膚試料で評価系を構築することが喫緊の課題となっている化粧品や医薬品メーカーに朗報をもたらす成果であり、高く評価できる。

著者が開発した低照射量電子線回折法による単一角層細胞上の細胞間脂質層の温度相転移挙動の解析結果

は、放射光 X 線回折による美容整形手術によって切り出された角層シートの温度相転移挙動の解析結果と比較検討されている。これまで、皮膚表面から剥離した角層試料を用いた実験が行われてきたが、剥離操作が細胞間脂質層にどのような影響を与えているか定量的な評価はなかった。本研究により、剥離された角層は、わずかな構造変化は見られるが、ほぼ角層内にあったときの構造的特徴を保持していることが明瞭に示されたことは、今後剥離した角層細胞試料を用いて行う研究にとって重要な基礎的知見を与えるものである。さらに、著者は、これまで行われてきた X 線回折実験では、複数の構造ドメイン由来の回折ピークが重なっているために難しかった細胞間脂質層の温度相転移挙動の詳細な解析を、局所的な構造解析が可能な電子線回折法の特長を利用して明らかにすることに成功している。電子線回折実験から得られた結果は、相転移の温度履歴を詳細に解析した放射光 X 線実験の結果と合わせて考察し、脂質側方充填構造のオーソロンビク-ヘキサゴナル相転移について、相転移過程で脂質分子の拡散がともなう相転移のモデルを提案している。これは、著者が実験結果を複合的に組み合わせてその意味を理解し、物理的描像を描く能力を有することを示している。

角層細胞間脂質層における脂質側方充填構造は、皮膚バリア機能と密接に関係していることが示唆されているが、著者が解析したオーソロンビク-ヘキサゴナル相転移が生理的温度付近で起こるため実験条件を制御するのがむずかしく、機能と構造の関係について確定的なデータは得られていない。本論文の成果は、こうした実験の条件を制御するために有益な情報を提供しており、今後の皮膚バリア機能と角層の構造の関係の解明に大きく資すると期待される。

本論文の前半の内容は、Chem. Phys. Lipids に筆頭著者として公表されている。また、皮膚角層構造に対する電子線損傷に関する論文は、第 2 著者として Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes に公表されている。また、著者は本論文の内容を国際学会で筆頭著者として 3 回報告している。審査委員は、本論文の内容を中心に面接と公開の論文発表会を行い、著者が論文内容と用いた技法について十分な理解とともに関連する分野についても学識を有し、また将来の研究遂行に対しても十分な能力を持つことを確認することができた。また、公表論文は英文で書かれており、国際的な研究環境において英語で情報発信していく十分な能力を有すると判定した。以上のことより、審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を授与されるに足る十分な資格を有するものと判定した。